

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
20. November 2003 (20.11.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 03/094953 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: A61K 38/42, A61P 39/00

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP03/03911

(22) Internationales Anmeldedatum:
15. April 2003 (15.04.2003)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
102 20 992.8 11. Mai 2002 (11.05.2002) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): SANGUIBIOTECH AG [DE/DE]; Alfred Herrhausen Strasse 44, 58455 Witten (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BARNIKOL, Wolfgang [DE/DE]; Lanzelhohl 66, 55128 Mainz (DE). PÖTZSCHKE, Harald [DE/DE]; Weidenstrasse 4, 65207 Wiesbaden (DE).

(74) Anwalt: MÜLLER, Claudia; Bürogemeinschaft Schnickel Darr Müller Scheid, Uhlandstrasse 58, 60314 Frankfurt/Main (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: OXYGEN CARRIER, SELECTED FROM HAEMOGLOBIN, MYOGLOBIN AND THEIR DERIVATIVES, FOR TREATING ORGAN DYSFUNCTION/TISSUE DAMAGE CAUSED BY AN ACUTE SUPPLY DEFICIENCY

(54) Bezeichnung: SAUERSTOFFTRÄGER, AUSGEWÄHLT AUS HÄMOGLOBIN, MYOGLOBIN UND DERIVATEN HIERVON, ZUR BEHANDLUNG EINER ORGANFUNKTIONSSTÖRUNG /GEWEBESCHÄDIGUNG DURCH AKUTEN VERSOR- GUNGSMANGEL

(57) Abstract: The invention relates to the use of one or more natural or modified oxygen carriers or their derivatives, for producing an agent for treating organ dysfunction caused by an acute supply deficiency and for treating/preventing tissue damage as a result of a dysfunction of this type. The inventive agent allows conditions caused by an acute oxygen and/or nutrient deficiency, such as tinnitus, cardiac infarction, stroke, sudden deafness, vertigo, placental insufficiency, renal shock or pulmonary shock to be treated. The oxygen carrier(s) can be of human or animal origin and can be used in the form of aqueous solutions containing, for example, the electrolyte concentrations that occur naturally or additional salts/additives. The oxygen carrier is used in solution in a concentration of between 2 and 200 g/litre, preferably between 10 and 80 g/litre over a period of between 1 day (e.g. single dose) and 6 weeks with multiple doses, according to requirements and prescription.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung eines oder mehrerer natürlicher oder modifizierter Sauerstoffträger oder Derivate hiervon, zur Herstellung eines Mittels, zur Behandlung einer Organfunktionsstörung infolge eines akuten Versorgungsmangels und zur Behandlung / Vermeidung einer Gewebeschädigung infolge einer solchen Störung. Insbesondere können erfindungsgemäss akute Sauerstoff- und / oder Nährstoffmangelzustände wie Tinnitus, Herzinfarkt, Schlaganfall, Hörsturz, Schwindel, Plazenta - Insuffizienz, Nierenschock oder Lungenschock behandelt werden. Der oder die Sauerstoffträger können menschlichen oder tierischen Ursprungs sein und eingesetzt werden als wässrige Lösungen, welche beispielsweise die natürlich vorliegende Elektrolytkonzentration oder auch weitere Salze / Zusatzstoffe aufweisen. Der Sauerstoffträger wird dabei in einer Konzentration von 2 bis 200 g / Liter Lösung, bevorzugt 10 bis 80 g / Liter über einen Zeitraum von 1 Tag (z.B. einmalige Gabe) bis zu 6 Wochen bei mehrfacher Gabe je nach Bedarf und Indikation eingesetzt.

WO 03/094953 A1

5

SAUERSTOFFTRAGER, AUSGEWÄHLT AUS HÄMOGLOBIN, MYOGLOBIN UND DERIVATEN HIERVON,
ZUR BEHANDLUNG EINER ORGANFUNKTIONSSTÖRUNG/GEWEBESCHÄDIGUNG DURCH AKUTEN
VERSORGUNGSMANGEL

Beschreibung

10

Gegenstand der Erfindung

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung eines oder mehrerer natürlicher
oder modifizierter Sauerstoffträger oder Derivaten hiervon, zur Herstellung eines
Mittels, zur Behandlung einer Organfunktionsstörung infolge eines akuten
15 Versorgungsmangels und zur Behandlung / Vermeidung einer Gewebeschädigung
infolge einer solchen Störung. Insbesondere können erfindungsgemäß akute
Sauerstoff- und / oder Nährstoffmangelzustände wie Tinnitus, Herzinfarkt,
Schlaganfall, Hörsturz, Schwindel, Plazenta - Insuffizienz, Nierenschock oder
Lungenschock behandelt werden. Der oder die Sauerstoffträger können
20 menschlichen oder tierischen Ursprungs sein und eingesetzt werden als wässrige
Lösungen, welche beispielsweise die natürlich vorliegende Elektrolytkonzentration
oder auch weitere Salze / Zusatzstoffe aufweisen. Der Sauerstoffträger wird dabei in
einer Konzentration von 2 bis 200 g / Liter Lösung, bevorzugt 10 bis 80 g / Liter über
einen Zeitraum von 1 Tag (z.B. einmalige Gabe) bis zu 6 Wochen bei mehrfacher
25 Gabe je nach Bedarf und Indikation. eingesetzt.

Hintergrund der Erfindung

Sauerstoffträger sowie künstliche Sauerstoffträger, hergestellt durch Modifikation
natürlicher Sauerstoffträger wie Hämoglobin oder Myoglobin zur Versorgung eines
30 lebenden Organismus mit Sauerstoff sind seit langem bekannt, vgl. DE 197 01 37,
EP 97 100790, DE 44 18 937, DE 38 41 105, DE 37 14 351, DE 35 76 651. Die
Hämoglobine oder Myoglobine werden auf bekannte Weise gewonnen und können

vernetzt werden, wobei vernetzte (intramolekular), polymere und insbesondere hyperpolymere Produkte entstehen. Daneben können die natürlichen Sauerstoffträger, welche gegebenenfalls zuvor auch vernetzt werden können, auch mit Polyalkylenoxiden kovalent verknüpft werden, vgl. Harris J. M., Poly(Ethylen Glykol) Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications, Plenum, New York, 1992).

In der PCT/US97/05088 (WO 97/35883) wird ein Verfahren beschrieben zur Herstellung eines Sauerstoffträger – Substituts, welches mit Pyridoxalphosphat umgesetzt und polymerisiert ist. Es kommt insbesondere bei chirurgischen Eingriffen, also bei Blutverlust, als Ersatzstoff zum Einsatz.

In der DE-A1 100 31 740 (WO 02/00230), DE-A1 100 31 744 und der DE-A1 100 31 742,1 werden modifizierte Sauerstoffträger bzw. besondere Verfahren zu deren Herstellung beschrieben, welche vernetzt, polymerisiert und mit Polyalkylenoxiden umgesetzt sind.

Die so hergestellten Träger werden als geeignet, insbesondere zur intravasalen oder biomedizinischen Anwendung, z.B. als Ersatz des Blutes, als Zusatz hierzu beschrieben, da solche Sauerstoffträger unter anderem eine besonders gute Plasmaverträglichkeit aufweisen. Ferner ist hier auch allgemein eine Anwendung bei einem chronischen Sauerstoffmangelzustand beschrieben, jedoch ohne Angabe von Art / Ort und Menge bzw. Dauer einer solchen Anwendung.

Allerdings ist bekannt, dass Hämoglobin und insofern auch künstliche Sauerstoffträger empfindlich gegenüber Oxidationsreaktionen sind, wobei das unwirksame Methämoglobin entsteht, das keinen Sauerstofftransport mehr zulässt. So wird in der EP-A 0 857 733 beschrieben, dass künstliche Sauerstoffträger zur Versorgung von lebenden Systemen besonders dann eingesetzt werden, wenn die Sauerstoffbindungsstellen zuvor mit einem Schutzliganden wie Kohlenmonoxid versehen wurden. Dieser Ligand wird vor der Anwendung nicht entfernt, sondern während er wirkt. Damit soll erreicht werden, dass die Funktion des Sauerstoffträgers allmählich, also nach und nach, je nach den jeweiligen Erfordernissen, freigegeben und dass bei der Anwendung an einem Patienten eine unerwünschte temporäre Überversorgung mit Sauerstoff vermieden wird (vgl. Spalte 5, Abs. 2 in der EP-A 857 733).

Die Anwendung des Schutzliganden Kohlenmonoxid hat zwar den Vorteil, dass eine Oxidation des Trägers unterbunden werden kann, allerdings ist, wie erwähnt, eine schnell eintretende oder auch gegebenenfalls gewünschte zeitliche Überversorgung mit Sauerstoff nicht möglich, da Kohlenmonoxid sehr fest an die:
5 Sauerstoffbindungsstellen ligandiert ist und nur langsam abgegeben wird.

Akute Versorgungsmangelzustände eines Organs und dadurch bedingte Funktionsstörungen mit der Folge einer möglichen Gewebeschädigung können unterschiedlichste Ursachen haben. Hierzu zählen z. B. Nährstoffmangelsituationen, oder akuter Sauerstoffmangel z.B. durch Stress, akute Gefäßverengung oder auch
10 aufgrund chronischer Mangelzustände wie z.B. chronische Gefäßverengung. So ist bekannt, dass bei Tinnitus – Erkrankungen oder bei Meniere'schem Syndrom eine Nährstofftherapie angewendet werden kann. Hier wird speziell eine Hyperlipoproteinämie zur Besserung bei den genannten Erkrankungen des Ohres vorgenommen.

15 Auch die reaktive Hypoglykämie kann als Ursache einer derartigen akuten Funktionsstörung wie der des Ohres (Tinnitus) auftreten. Ebenso gilt auch Magnesiummangel z.B. als ein Faktor in der Tinnitusentwicklung. Zusätzlich gelten Elektrolytstörungen als Tinnitusursache.

Daher wurden derartige Versorgungsmangelzustände bisher z.B. durch
20 Verabreichung von Lösungen, enthaltend die o.g. Nährstoffe, vor allem aber auch Insulin in angemessener Dosierung behandelt.

Eine andere Methode der Behandlung der genannten Funktionsstörungen besteht in der direkten respiratorischen Verabreichung von reinem Sauerstoff(gas), nämlich als hyperbare Sauerstofftherapie (HBO), oder auch durch Anwendung elektrischer
25 Reize.

Mit diesen Methoden soll eine schnelle Behebung derartiger Versorgungsmängel erreicht werden, jedoch ist oftmals eine Schädigung des zeitlich unterversorgten Gewebes nicht zu vermeiden. Darüber hinaus ist bei Einsatz von reinem Sauerstoff darauf zu achten, dass – obwohl zunächst eine hohe Menge hiervon, also eine
30 zeitliche Überversorgung erforderlich sein kann - eine oxidative Toxifizierung via überkonzentrierten (überspannten) Sauerstoff vermieden werden muss.

Aufgabe der Erfindung

- Aufgabe vorliegender Erfindung ist es daher, ein Mittel zu finden, mit welchem eine Organfunktionsstörung infolge eines akuten Versorgungsmangels, insbesondere einer Sauerstoffversorgungs-
5 Störung wirksam behoben wird und andererseits ein Dauerschaden des Gewebes als Folge der Störung sowie eine Toxifizierung behandelt bzw. vermieden werden kann.

Erläuterung der Erfindung

- 10 Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, dass man dem mit der Funktionsstörung infolge eines akuten Versorgungsmangels behafteten Organismus ein Mittel bereitstellt und verwendet, das einen oder mehrere Sauerstoffträger aufweist, die in einer Konzentration von 2 bis 200 g/Liter Medium, d.h. 0.2 bis 20 Gew. %, enthalten sind.
- 15 Der oder die Sauerstoffträger sind ausgewählt aus Hämoglobin, Myoglobin oder Derivaten hiervon. Sie sind demnach natürlich oder bevorzugt vernetzt, polymerisiert und/ oder pegyliert d.h. mit einem Polyalkylenoxid kovalent verknüpft. Ganz besonders bevorzugt sind als Sauerstoffträger solche, die sowohl vernetzt, polymerisiert (intermolekular vernetzt) und insbesondere auch pegyliert sind. Die
- 20 Sauerstoffträger können humanen oder tierischen Ursprungs sein.
Bei letzteren kann insbesondere auch ein reaktiver und / oder nicht reaktiver Effektor bei der Herstellung wie nachfolgend beschrieben eingesetzt worden sein.
Gegebenenfalls kann der Sauerstoffträger, insbesondere wenn dieser sowohl vernetzt, polymerisiert als auch pegyliert ist, wobei ggf. Effektoren bei der Herstellung
- 25 bzw. chemische Effektoren verknüpft sein können, auch karbonyliert sein.
Erfindungsgemäß zeigte sich, dass mittels der genannten Sauerstoffträger eine sofortige Behandlung des sich im Versorgungsmangelzustand befindlichen Organs mit ausreichenden Mengen niedergespannten Sauerstoffs, nämlich bioverfügbarem Sauerstoff, möglich ist, wobei eine Toxifizierung und auch eine Gewebeschädigung
- 30 vermieden bzw. behandelt werden kann. Dies ist insbesondere durch die reversible Bindung an den Träger gewährleistet. Dabei wird der Sauerstoffträger insbesondere als Infusion über einen erforderlichen Zeitraum von z.B. 1 Tag bis mehreren Tagen

ein- bis mehrfach, gegebenenfalls bis mehrere Wochen solange zugeführt, bis der akute Mangelzustand insofern behoben ist als das betreffende Organ wieder regelrecht arbeitet. Die Verabreichung kann auch danach noch darüber hinaus erfolgen, je nach Zustand und Bedingungen der Situation, um eine endgültige Heilung zu erreichen. Der oder die Sauerstoffträger können in den angegebenen Mengen wie beschrieben, als eine Infusionslösung, vorzugsweise zusammen mit den nachfolgend beschriebenen Zusatzstoffen verabreicht werden.

Insbesondere wird erfindungsgemäß ein akuter Versorgungsmangel, vor allem aufgrund eines Sauerstoffmangels (Sauerstoffversorgungskrise), durch akute oder chronische Gefäßverengung, Stress, Spasmus oder Arteriosklerose behandelt. Es kann auch ein Nährstoffmangel oder Kombinationen hiervon mit einem Sauerstoffmangel behandelt werden. Besonders werden die genannten akuten Krisen infolge der genannten Sauerstoffmangelzustände behandelt.

Ein Nährstoffmangel kann sich aus einer Unterversorgung mit physiologisch essentiellen Elektrolyten und / oder Glukose oder Kombinationen hiervon ergeben, wobei auch das Hormon Insulin eine entscheidende Rolle spielt.

Eine derartige Wirkungsweise war nicht zu erwarten, da der Stand der Technik angab, dass insbesondere künstliche Sauerstoffträger allgemein bei chronischen Sauerstoffmangelzuständen einsetzbar seien, wobei jedoch andere Bedingungen vorliegen als bei einem akuten Versorgungsmangelzustand, wie z.B. bezüglich der vegetativen Regelung und der vorliegenden Konzentrationsprofile essentieller Stoffe. Es war daher überraschend, dass die wie erfindungsgemäß beschriebenen Mengen an Sauerstoffträger tatsächlich eine derart kontrollierte Behebung der Mangelsituation zur Folge haben, da einerseits derartige Mangelzustände vollkommen anderen Mechanismen der Behebung zugeordnet wurden und andererseits trotz der anfänglich hohen Menge an dann vorhandenem Sauerstoff eine schnelle funktionelle Organbelebung erzielt wird, zumal der ermittelte Bereich des dann vorliegenden Sauerstoff-Partialdrucks viel geringer ist als unter Einleitung von reinem Sauerstoff. Somit ist eine physiologische Versorgung mit bioverfügbarem (unter kleinem Partialdruck stehenden) Sauerstoff ohne die geringste schädigende Wirkung möglich.

Die Gewinnung derartiger Sauerstoffträger humanen oder tierischen Ursprungs ist bekannt. Eine Zellyse erfolgt hierbei ohne Gefrieren, so dass das Produkt Zellwand- und Plasma- frei sowie stromafrei ist. Der Sauerstoffträger kann nach bekannter Reinigung, welche auch in den vorgenannten Schriften erläutert ist, direkt eingesetzt werden z.B. in physiologischer Natriumchloridlösung oder in anderen wie nachfolgend beschriebenen wässrigen Lösungen.

Der Sauerstoffträger ist bevorzugt mit einem Vernetzer vernetzt, polymerisiert.

Der Sauerstoffträger, welcher Hämoglobin oder Myoglobin oder Mischungen hiervon, bevorzugt Hämoglobin oder auch Hämoglobin – Myoglobin - Mischungen, sein kann, kann auch mit einem Polyalkylenoxid kovalent verknüpft sein, welches ausgewählt ist aus Polyethylenoxid, Polypropylenoxid, oder einem Copolymer aus Ethylenoxid und Propylenoxid oder einem Ester, Ether oder Esteramid hiervon. Besonders bevorzugt werden Sauerstoffträger eingesetzt, die mit einem Polyethylenoxid bzw. geeigneten Derivat hiervon verknüpft sind.

Es ist ferner bevorzugt, wenn das kovalent angeknüpfte Polyalkylenoxid eine Molare Masse von 200 bis 5000 g/mol aufweist.

Ganz besonders bevorzugt sind der oder die Träger wie beschrieben vernetzt, polymerisiert und mit einem Polyalkylenoxid kovalent verknüpft (pegyliert), wie in DE-A1 100 31 740 (WO 02/00230), DE-A1 100 31 744 und der DE-A1 100 31 742,1 beschrieben.

Die Sauerstoffträger, vor allem die bevorzugten, können gegebenenfalls auch karbonyliert sein.

Besonders geeignete Sauerstoffträger sind Hämoglobine bzw. wie oben beschrieben modifizierte Hämoglobine mit einem Molekulargewicht von 65 000 bis, insbesondere von 70 000 bis 15 000 000 g/mol, insbesondere 90 000 bis 15 000 000, wobei solche mit einem Molekulargewicht von 300 000 bis 15 000 000, vor allem 300 000 bis 10 000 000, insbesondere von 700 000 bis 10 000 000, bevorzugt 700 000 bis 5 000 000 g/mol, besonders bevorzugt sind, oder auch Myoglobine bzw. modifizierte Derivate hiervon mit einem Molekulargewicht von 15 000 g/ Mol bis 5 000 000 g/Mol, bevorzugt 100 000 bis 3 000 000 oder auch 200 000 bis 3 000 000 oder Mischungen von Hämoglobin – und Myoglobin – Sauerstoffträgern wie angegeben .

Bei Mischungen kann das Verhältnis von Hämoglobin- zu Myoglobin – Sauerstoffträger oder Derivaten hiervon von 20:1 bis 1:20, insbesondere 10:1 bis 1:10 betragen.

Ebenso kann das Verhältnis von natürlichem zu modifiziertem Sauerstoffträger 20.1
5 bis 1:20, vor allem 10.1 bis 1.10 betragen.

Der oder die erfindungsgemäß eingesetzte(n) Sauerstoffträger sind dann wirksam, wenn eine Konzentration von 0,2 bis 20 Gew.%, insbesondere 1 bis 18 Gew.%, vor allem 3 bis 15, bevorzugt 3 bis 12 Gew.% besonders 5 bis 10 Gew.% im für die Behandlung vorgesehenen Medium vorliegt. Demnach liegen im Medium 2 bis 200
10 g/Liter bzw. 10 bis 180g oder 30 bis 150 bzw. 120g bzw. 50 bis 100 g /Liter an Sauerstoffträger vor. Das Medium ist insbesondere Wasser.

Der oder die Sauerstoffträger können, falls erforderlich, kurz vor der Anwendung extern mit Sauerstoff in an sich bekannter Weise über geeignete Austauscher mit Sauerstoff gesättigt und den Zellen zugeführt werden. Es können auch verschiedene
15 Sauerstoffträger der genannten Art als Mischung zugesetzt werden, wie oben beschrieben. So können beispielsweise solche mit einem mittleren Molekulargewicht von 70 000 bis , besonders 90 000 bis 10 000 000, besonders 1000000, g/Mol aus Schweinehämoglobin mit einem aus Myoglobin hergestellten Sauerstoffträger mit einem Molekulargewicht von 15 000 bis 5 000 000, vor allem 100 000 bis 1000000
20 g/Mol zusammen eingesetzt werden.

Die Sauerstoffträger, insbesondere die künstlichen Derivate, der beschriebenen Art können hergestellt sein wie im oben genannten Stand der Technik beschrieben, der hier inkorporiert ist.

Insbesondere bevorzugt sind solche, die hergestellt sind wie in der DE-A 100 31 740
25 (WO 02/00230), DE-A 100 31 742 und DE-A 100 31 744 beschrieben. Hierzu werden an die mit einem Vernetzer vernetzten Hämoglobin- oder Myoglobinmoleküle Polyalkylenoxide mäßig hohen Molekulargewichtes kovalent gebunden. Einzelheiten des Verfahrens zur Herstellung solcher künstlicher Sauerstoffträger sind oben beschrieben, (z.B. in der DE-A100 31 740), hierin wie angegeben inkorporiert und
30 lassen sich wie folgt zusammenfassen:

Als Hämoglobin (oder Myoglobin) -Ausgangsmaterial zur Herstellung der erfindungsgemäß eingesetzten Sauerstoffträger eignet sich monomeres, natives oder

mit gewissen Effektoren, z. B. der Sauerstoffaffinität des Hämoglobins (Myoglobins) wie beispielsweise Pyridoxal-5'-Phosphat oder 2-Nor-2-Formyl-Pyridoxal-5'-Phosphat, chemisch umgesetztes und modifiziertes Myoglobin oder Hämoglobin vom Menschen, vom Schwein, oder vom Rind. Bevorzugt ist humanes und insbesondere
5 Schweine-Hämoglobin. Das Hämoglobin oder Myoglobin kann gegebenenfalls vor der Anwendung durch Karbonylierung desoxygeniert sein.

Die Vernetzung monomeren, nativen oder mit Effektoren verknüpften Hämoglobins oder Myoglobins mit etlichen Vernetzern sind bekannt und in der Literatur vielfach beschrieben vgl. die oben genannten deutschen Anmeldungen. Beispielhaft seien
10 angeführt: Divinylsulfon, Epichlorhydrin, Butadiendiepid, Hexamethylendiisocyanat, den Dialdehyden Glyoxal und Glutardialdehyd sowie den Diimidoestern Dimethyl-suberimidat, Dimethylmalonimidat und Dimethyladipimidat. Ferner sind auch Umsetzungen mit Dialdehyden, beispielsweise Malondialdehyd, Succindialdehyd, Glutardialdehyd, Adipindialdehyd und Suberdialdehyd, und Glyoxal, aber auch mit
15 strukturell komplexeren Verbindungen bekannt, die durch oxidative Ringöffnung der zyklischen Halbazetal- und Halbketalstrukturen der Zuckermoleküle in Mono-sacchariden und Oligosacchariden erfolgen, oder die durch Umsetzung mit den Dialdehyden o-Adenosin und o-ATP, entstanden durch ringöffnende Oxidation der Ribose in Adenosin und in Adenosintriphosphat, hergestellt sind. Es können dabei
20 unterschiedliche Molekulargewichte erhalten werden, vgl. EP 0 201 618. Jeweils bezogen auf monomeres Hämoglobin / Myoglobin werden molare Verhältnisse der verwendeten Vernetzer – insbesondere der bifunktionellen Vernetzter – von 3- bis 60-fach, bevorzugt 6- bis 35-fach, eingesetzt. Bezüglich Glutardialdehyd wird bevorzugt zwischen einem 7- und 10-fachen molaren Überschuss am Glutar-
25 dialdehyd eingesetzt. Chemisch nicht stabile Verknüpfungen, insbesondere die Schiffchen Basen, die bei der Reaktion von funktionellen Aldehydgruppen mit Aminogruppen der Hämoglobine entstehen, werden in bekannter Weise reduktiv durch Reaktion mit geeigneten Reduktionsmitteln, wie z. B. Natriumborhydrid, in einem hinreichenden molaren Überschuss, bezogen jeweils auf monomeres
30 Hämoglobin, bevorzugt 2- bis 100-fach, insbesondere bevorzugt 5- bis 20-fach, unter geeigneten bekannten Bedingungen stabilisiert.

Die genannten Verfahren sind bekannt und hierin inkorporiert.

Bevorzugt werden bifunktionelle Vernetzer zur Vernetzung der Hämoglobine / Myoglobine gewählt, z.B. Butandiepid, Divinylsulfon, ein Diisocyanat, insbesondere Hexamethyldiisocyanat, Zyklohexyldiisocyanat und 2,5-Bisisocyanatobenzolsulfonsäure, ein Di-N-Hydroxysuccinimidylester, ein Diimidoester, oder ein Dialdehyd, insbesondere Glyoxal, der analog reagierende Glykolaldehyd, oder Glutardialdehyd. Besonders bevorzugt ist Glutardialdehyd.

Die Umsetzung mit dem Polyalkylenoxid, welche an sich, insbesondere aber zusätzlich, d.h. vor oder nach oder während der Vernetzung erfolgen kann, ist ebenfalls in den oben genannten deutschen Anmeldungen beschrieben und hierin inkorporiert. Es wird im wesentlichen mit einem Polyalkylenoxid oder einem Derivat hiervon umgesetzt wie z.B. Polyethylenoxid, Polypropylenoxid, oder Kopolymere aus Ethylenoxid und Propylenoxid.

Insbesondere bevorzugt ist das Polyalkylenoxid - Derivat ein Ether, ein Ester, oder ein Esteramid mit einem kurzkettigen aliphatischen organische Rest ist.

Das kovalent angeknüpfte Polyalkylenoxid hat bevorzugt eine Molare Masse zwischen 200 und 5000 g/mol, vorzugsweise zwischen 500 und 2000 g/mol.

Zur kovalenten Anknüpfung der Polyalkylenoxide werden bevorzugt solche Derivate der Polyalkylenoxide verwendet, die ein verknüpfendes ~~Agens mit einer~~ funktionellen Gruppe bereits kovalent gebunden enthalten, welche eine direkte chemische Reaktion mit Amino-, Alkohol-, oder Sulfhydryl-Gruppen der Hämoglobine unter Bildung kovalenter Anknüpfungen der Polyalkylenoxide ergeben – beispielsweise Polyalkylenoxide mit reaktiven N-Hydroxysuccinimidylester-, Epoxid- (Glycidylether-), Aldehyd-, Isocyanat-, Vinylsulfon-, Jodazetamid-, Imidazolylformat-, Tresylatgruppen, u. a. Viele solche monofunktionell aktivierte Polyethylenglykole sind kommerziell erhältlich.

Es ist ferner bevorzugt, wenn im erfindungsgemäß eingesetzten Produkt die Anzahl der angeknüpften Polyalkylenoxide zwischen 1 und 40, insbesondere 4 bis 15, Moleküle Polyalkylenoxid pro Molekül des Hämoglobinmonomeren beträgt.

Die kovalente Anknüpfung des Polyalkylenoxids kann wie geschildert zuerst und erst anschließend die Vernetzung wie beschrieben erfolgen. Schließlich kann eine kovalente Anknüpfung eines Polyalkylenoxids auch sowohl zunächst vor der

Vernetzung, als auch zusätzlich nach der Vernetzung erfolgen. Auf- und Weiterverarbeitung können auch bei diesen Alternativen unverändert wie beschrieben durchgeführt werden.

Die Bedingungen der Anbindungen des Polyalkylenoxids sind in den oben genannten

5 deutschen Anmeldungen im einzelnen dargelegt und daher hier inkorporiert.

Bei der Herstellung der erfindungsgemäß eingesetzten Sauerstoff – transportierenden Mittel können auch vor der kovalenten Vernetzung des Hämoglobins chemisch nicht reagierende Effektoren der Sauerstoffaffinität des Hämoglobins / Myoglobins zu dessen Reaktionslösung hinzu gegeben werden. Als

10 Effektoren der Sauerstoffaffinität des Hämoglobins / Myoglobins eignen sich insbesondere 2,3-Bisphosphoglycerat, Inositolhexaphosphat, Inositolhexasulfat oder Mellitsäure, wobei 2,3-Bisphosphoglycerat besonders geeignet ist.

Die Bedingungen für den Einsatz solcher nicht reaktiver Effektoren sind wie erwähnt in der DE-A 100 31 742 beschrieben.

15

Besonders bevorzugt werden Sauerstoffträger erfindungsgemäß eingesetzt, welche hergestellt wurden (vgl. DE 100 31 744/0), indem hoch gereinigtes Hämoglobin oder auch Myoglobin

- i) zunächst desoxygeniert wird;
- 20 ii) anschließend kovalent mit einem Effektor der Sauerstoffbindung umgesetzt wird;
- iii) dann die Lösung mit einem nicht chemisch reaktiven Effektor versetzt wird; und sodann
- iv) 25 das Hämoglobin mit Glutardialdehyd in einer inversen Konzentrationsgradienten-Reaktion, bezogen auf die Konzentration des Vernetzers und des zu vernetztenden Hämoglobins, stabil kovalent miteinander vernetzt wird, anschließend die Lösung mit Wasser verdünnt wird, und sodann
- v) ein Polyethylenoxid kovalent angeknüpft wird
- 30 vi) das erhaltene Produkt in bekannter Weise aufgearbeitet wird.

Ganz besonders bevorzugt erfolgt hier die Vernetzung mit Glutardialdehyd, wie z. B. in Pötzschke H. und Barnikol W. (1992), *Biomaterials, Artificial Cells, and Immobilization Biotechnology* 20: 287 – 291, oder wie in den nachfolgenden Beispielen beschrieben. Effektoren, die chemisch bzw. nicht chemisch reagieren, sind oben
5 bzw. ebenfalls in der oben genannten Druckschrift DE-A 100 31 744 oder DE-A 100 31 742 erläutert.

Das Molekulargewicht der wie geschildert hergestellten Sauerstoffträger liegt im vorgenannten Bereich.

10 Insbesondere können die so hergestellten Sauerstoffträger wie beschrieben auch gereinigt werden wie , z. B. chromatographisch (z. B. durch präparative Volumenausschluss-Chromatographie) durch Zentrifugation, Filtration oder Ultrafiltration gereinigt, in Fraktionen unterschiedlichen Molekulargewichts aufgetrennt und nachfolgend weiterverarbeitet werden, vgl. z.B. DE-A 100 31 740
15 bzw. WO 02/ 00230.

Vor dem erfindungsgemäßen Einsatz kann, sofern erforderlich, der oder die Sauerstoffträger auf bekannte Weise oxygeniert werden.

20 Es ist ferner bevorzugt, wenn der oder die eingesetzten Sauerstoffträger einen Partialdruck p_{50} weniger als 26 Torr, insbesondere 13 bis 22 und bevorzugt 15 bis 20 Torr aufweist. Der Sauerstoffpartialdruck p_{50} ist dabei der Druck, bei dem der Träger hälftig Sauerstoff gebunden hat. Darüber hinaus sollte der Träger auch eine genügend große Kooperativität aufweisen, welche als sog. Hillscher Index
25 quantifiziert werden kann. Der Normalwert des Blutes beträgt 2,6. Es hat sich gezeigt, dass die Kooperativität des erfindungsgemäß eingesetzten Trägers nicht kleiner als 2,0 sein sollte.

Es ist bevorzugt, wenn der erfindungsgemäß eingesetzte, ggf. derivatisierte Sauerstoffträger aus Hämoglobin vom Rind, Schwein oder vom Menschen stammt.

30 Insbesondere bevorzugt ist wegen seiner strukturellen und funktionellen Ähnlichkeit Schweinehämoglobin.

Daneben ist auch Humanhämoglobin bevorzugt.

Der Sauerstoffträger kann auch Myoglobin bzw. das wie oben beschrieben modifizierte Produkt hiervon sein oder Mischungen hiervon mit Hämoglobin-Derivaten. Dabei ist Schweinehämoglobin, insbesondere Humannahämoglobin bevorzugt.

- 5 Auf die erfindungsgemäße Weise wird überraschenderweise durch eine momentan ausreichende, jedoch nicht toxische Menge an Sauerstoff eine sofortige Verbesserung des Mangelzustandes erzielt. Dabei kann durch Zugabe weiterer geeigneter Zusätze wie Salze, Glukose, Insulin, einer oder mehrerer natürlicher für den zu behandelnden Patienten geeignete Aminosäuren oder Mischungen eine
10 weitere Verbesserung des Mangelzustandes erzielt werden.

Besonders bevorzugte Sauerstoffträger oder Mischungen hiervon sind solche, welche, ggf. mit einem chemisch reaktiven / nicht reaktiven Effektor umgesetzt / behandelt, zum einen mit Glutardialdehyd vernetzt und mit einem Polyethylenoxid oder Derivat hiervon mit einem Molekulargewicht von 1500 bis 2000 g/Mol pegyliert
15 sind und ein Gesamtmolekulargewicht von 300 000 bis 15 000 000, insbesondere 700 000 bis 10 000 000 bezogen auf Hämoglobin oder 100 000 bis 3 000 000 oder auch 200 000 bis 1 000 000 g/Mol bezogen auf Myoglobin, aufweisen.

Die erfindungsgemäßen Mittel werden hergestellt durch Mischen des oder der Sauerstoffträger im Medium, insbesondere wässrigen Medium. Die Medien auf
20 wässriger Basis können geeignete Zusatzstoffe, insbesondere 0 bis 20 %, bezogen auf das Volumen, vorzugsweise 0,01 bis 20 Gew.%, insbesondere 0,1 bis 20 Gew.% und vor allem 0,1 bis 15%, enthalten. Diese sind vorzugsweise ausgewählt aus Glukose, für die jeweilige Anwendung natürliche Aminosäuren, also die für Menschen oder auch Tiere natürlichen Aminosäuren, weiterhin Insulin, jeweils in für die
25 betreffende Anwendung physiologischer Konzentration oder Vielfachen davon, ferner auch geeignete bekannte Antibiotika, Gewebefaktoren sowie natürliche und / oder künstliche Puffersubstanzen wie TRIS, Bicarbonat, Phosphat sowie physiologisch verträgliche Salze wie Natriumchlorid, Kaliumchlorid, Kalzium- Magnesiumchlorid, Natriumcitrat, Natriumlactat ebenfalls in für die jeweilige Anwendung geeigneter,
30 insbesondere physiologischer Konzentration oder Mehrfachen davon, oder Mischungen hiervon .

Kalium- Kalzium- Magnesiumchlorid, Natriumhydrogen-(bi)carbonat, Natriumcitrat, Natriumlactat, also die bekannten Elektrolyten können z.B. in physiologischer Konzentration oder auch Vielfachen hiervon, z. B. bis zum 10fachen, also in Mengen von 0,1 bis 30 oder bevorzugt 0,5 bis 10 Gew. %, bevorzugt 0,5 bis 5 Gew. %, insbesondere 0,8 bis 1,5 Gew. % vorliegen, wobei hierfür insbesondere Natriumchlorid geeignet ist. Die Elektrolyten können auch im Gemisch vorliegen. Die Puffersubstanzen können so eingesetzt werden, dass ein pH-Wert wie angegeben, vor allem aber von 7,4 vorliegt.

Glukose kann z.B. in Mengen von 0,1 bis 5 Gew. % , Insulin in physiologischer Dosierung oder in Mengen von bis zu 25 IE/ml, die für die jeweilige Anwendung bekannten natürlichen Aminosäuren, also die für den Menschen oder für die jeweiligen Tiere bekannten Aminosäuren z. B. 0 oder 0,01 bis zu 5 Gew. %, oder auch Gewebefaktoren, wie Interleukine in physiologischen Mengen bis zur 10fachen Menge hiervon vorliegen.

Besonders bevorzugte Zusätze sind physiologische Natriumchloridlösung (0,8 bis 1,5% ,insbesondere 0,9%) ,Glukose (in Mengen wie oben angegeben , bevorzugt z.B. 1%) sowie Insulin in physiologischer Dosierung, ggf. bis zum 5-Fachen hiervon, und auch Mischungen hiervon. Hier können auch vor allem Kaliumchlorid, Magnesiumchlorid, Natriumbicarbonat oder Mischungen hiervon in den oben angegebenen Mengen zugesetzt bzw. zusätzlich zugesetzt werden.

Insbesondere hat sich gezeigt, dass der oder die erfindungsgemäß eingesetzten Sauerstoffträger über einen weiten pH - Bereich, nämlich von 5,5 bis 9, insbesondere 6,5 bis 8 wirksam sind. Insbesondere kann bei der Behebung eines Organversorgungsmangels ein pH-Wert von 7,4 im verabreichten Medium wie der Infusion vorliegen.

Der oder die dem Medium / Infusion zugesetzten Sauerstoffträger geben den Sauerstoff wie erwähnt durch Diffusion ab, so dass eine ausreichende Versorgung der Gefäße mit Sauerstoff, vorzugsweise Sauerstoff und Elektrolyten derart erfolgt, dass eine dauerhafte Schädigung von Gewebe aufgrund des Mangels vermieden bzw. behandelt werden kann. Dies erfolgt im angegebenen Konzentrationsbereich. Dieser wird während der Behandlung kontrolliert und gegebenenfalls der Sauerstoffträger zugesetzt, um im erfindungsgemäßen Bereich zu bleiben.

Es kann auch nach der Behebung der akuten Krise eine Fortführung der Behandlung erfolgen, wobei dann der Menge an zugesetztem Sauerstoffträger gegebenenfalls reduziert werden kann. Dieser Konzentrationsbereich ist besonders wichtig, da weder eine Über – noch eine Unterdosierung erfolgen darf.

- 5 Insbesondere werden erfindungsgemäß Tinnitus, Herzinfarkt, Schlaganfall, Hörsturz, Schwindel, Plazenta - Insuffizienz, Nierenschock oder Lungenschock behandelt. So können zur Behebung einer Funktionsstörung von Herz, Niere, Lunge, Gehirn bevorzugt 5 bis 150 g / Liter Medium, insbesondere 7 bis 90 g/L, an Sauerstoffträger. Bei Schwindel, Störungen des Ohres oder der Plazenta können 10 bis 180 g / Liter oder auch 15 bis 120 g / Liter eingesetzt werden.

Bei Schlaganfall und Herzinfarkt werden Infusionen insbesondere bereits während der akuten Phase des Ereignisses eingesetzt.

- Besonders bevorzugt werden die Sauerstoffträger in einer Menge von 10 bis 80 g/Liter, vor allem 12 bis 50 g/Liter (Infusions)Medium verabreicht, so dass während 15 der Verabreichung im Gewebe ein mittlerer Sauerstoffpartialdruck von etwa 30 mm Hg vorliegt, der nicht zu hoch ist, um eine oxidative, schädliche Überversorgung zu bedingen, aber ausreicht, um den akuten Mangelzustand zu beheben. Insbesondere werden die Sauerstoffträger gemäß der DE-A1 100 31 740 (WO 02/00230), DE-A1 100 31 744 und der DE-A1 100 31 742,1 und hierunter besonders diejenigen mit 20 einem mittleren Molekulargewicht von 700 000 bis 5 000 000 g/Mol (Hämoglobine) bzw. 100 000 bis 1 000 000 g/Mol (Myoglobine) verabreicht.

Beispiele

Die Erfindung wird anhand der nachfolgenden Beispiele näher erläutert.

25

I. Herstellung von erfindungsgemäßen Mitteln

Beispiel 1

- Humanes natürliches Hämoglobin wurde durch Zentrifugation und Ultrafiltration vom 30 Plasma und Zellwandbestandteilen befreit und gereinigt.

Hiervon wurden 8 Gew. % in 100 ml Wasser, enthaltend 0,9 Gew. Natriumchlorid sowie 5 Gew. % Glukose und 20 IE/ml Insulin gelöst.

Beispiel 2

Schweinehämoglobin, in einer Konzentration von 330 g/L gelöst in einem wässrigen Elektrolyten der Zusammensetzung 50 mM NaHCO₃ und 100 mM NaCl, wurde bei 4 °C durch Rühren der Lösung unter ständig erneuertem, reinen Stickstoff über der

5 Lösung desoxygeniert. Anschließend wurden 4 mol Natrium-Ascorbat (als 1-molare Lösung in Wasser) pro Mol (monomeren) Hämoglobins zugegeben und 6 h reagieren lassen. Die Lösung wurde mit 0,5-molarer Milchsäure auf einen pH-Wert von 7,1 titriert, 1,1 Mol Pyridoxal-5'-Phosphat je Mol Hämoglobin zugegeben und für 16 h reagieren lassen. Nun wurde mit 0,5-molarer Natronlauge ein pH-Wert von 7,8

10 eingestellt, 1,1 Mol Natriumborhydrid (als 1-molare Lösung in 0,01-molarer Natronlauge) zugegeben und für eine Stunde reagieren lassen. Jetzt wurde mit 0,5-molarer Milchsäure ein pH von 7,3 eingestellt, zunächst 1,1 Mol 2,3-Bisphosphoglyzerat pro Mol Hämoglobin und nach 15 min Reaktionszeit 8 Mol Glutardialdehyd je Mol Hämoglobin, gelöst in 1,8 L reinem Wasser je Liter

15 Hämoglobinlösung zur Vernetzung des Hämoglobins innerhalb 5 Minuten zugegeben und 2,5 h reagieren lassen. Nach Titration mit 0,5-molarer Natronlauge auf einen pH-Wert von 7,8 folgte eine Zugabe von 15 Mol Natriumborhydrid (als 1-molare Lösung in 0,01-molarer Natronlauge) je Mol Hämoglobin für 1 h. Es erfolgte eine Zugabe von 2 Liter Wasser je Liter ursprünglicher Hämoglobinlösung. Der pH-Wert betrug dann

20 9,3 und es folgte direkt eine Zugabe von 4 Mol Methoxy-Succinimidylpropionat-Polyethylenglykol des Molekulargewichts 2000 g/Mol für 2 h. Die Stickstoffatmosphäre über der Lösung wurde durch reinen Sauerstoff ersetzt.

Nach 1 h wurden unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation (20000 g für 15 min) abgetrennt. Anschließend erfolgte ein Wechsel des Elektrolyten durch eine

25 Volumenausschluss-Chromatographie (Sephadex G-25 - Gel, Pharmacia, D) zu einer wässrigen Elektrolyt-Lösung der Zusammensetzung 125 mM NaCl, 4,5 mM KCl und 20 mM NaHCO₃.

Die Ausbeute betrug 77 %; die Ausbeute für Molekulargewicht größer 700 000 g/Mol ist 28 %.

30 Messungen der Charakteristik der Sauerstoffbindung unter physiologischen Bedingungen (eine Temperatur von 37 °C, ein Kohlendioxid-Partialdruck von 40 Torr

und ein pH-Wert von 7,4) ergaben für das Produkt einen p50-Wert von 22 Torr und einen n50-Wert von 1,95.

Dieser Sauerstoffträger ist für den erfindungsgemäßen Einsatz in wässriger Lösung wie in Beispiel 1 beschrieben, besonders geeignet.

5

Beispiel 3

Die Synthese des mit Glutardialdehyd vernetzten Humanhämoglobins erfolgte wie in Beispiel 2, jedoch unter Verwendung von konzentriertem Humanhämoglobin und Einsatz des 16-fachen molaren Überschusses des Vernetzers. Polymere wurden
10 durch Fraktionieren der Lösung der Vernetzungsprodukte mit Hilfe einer präparativen Volumenausschluss-Chromatographie (gemäß EP-A 95 10 72 80.0: „Verfahren zur Herstellung molekular-einheitlicher hyperpolymerer Hämoglobine“ mit Sephacryl S-300 HR - Gel, Pharmacia Biotech, Freiburg, D) gewonnen (hier als die zuerst eluierten 57 Massen-% des vernetzten Hämoglobins).

15 Die vernetzten Hämoglobine wurden in zwei Teile A und B aufgeteilt. Das Hämoglobin A (vergleiche Abbildung 3) erwies sich als überwiegend polymeres Hämoglobin mit einem Modalwert der Molekulargewichtsverteilung von 950 kg/mol (vergleiche Beispiel 1). Kovalentes Anbinden von monofunktionell aktivem mPEG-SPA-1000 erfolgte analog der in Beispiel 2 für vernetztes Schweinehämoglobin beschriebenen Vorgehensweise. Nach der Addition von Natriumhydrogenkarbonat (bis zu
20 150 mM) zur Lösung der Polymeren konnte ein 12-facher molarer Überschuss mPEG-SPA-1000 mit den Hämoglobin-Monomeren reagieren. Im Anschluss an eine Reaktionszeit von einer Stunde wurde Lysin im 60-fachen molaren Überschuss zum ‚Abfangen‘ noch aktiver Moleküle des mPEG-SPA-1000 zugegeben. Sowohl das
25 vernetzte Hämoglobin gemäß Lösung A als auch das vernetzte und pegylierte Produkt gemäß Lösung B sind für den erfindungsgemäßen Einsatz geeignet.

Beispiel 4

Vernetztes Rinderhämoglobin wurde hergestellt durch Vernetzen von konzentriertem
30 Rinderhämoglobin mit einem 14-fachen molaren Überschuss Glutardialdehyd gemäß Beispiel 2, eine molekulare Fraktionierung der Syntheseprodukte, das Anbinden von mPEG-SPA-1000 gemäß Beispiel 2 bzw. 3.

Eine Molekulargewichtsverteilung des nicht modifizierten Hämoglobin-Polymeren zeigt Abbildung 5, nämlich ein Eluogramm einer Volumenausschluss-Chromatographie (am Gel „Sephacryl S-400 HR“, Pharmacia Biotech, Freiburg, D), der Modalwert der Molekulargewichtsverteilung beträgt hier 810 kg/mol.

5

Beispiel 5

Konzentriertes, desoxygeniertes Schweinehämoglobin gelöst in einem wässrigen Elektrolyten der Zusammensetzung 50 mmol/L NaHCO₃ und 100 mmol/L NaCl wurde bei Raumtemperatur mit dem 14-fachen molaren Überschuss an Glutardialdehyd umgesetzt. Natriumcyanoborhydrid, im 10-fachen molaren Überschuss zum (monomeren) Hämoglobin zugesetzt, reduzierte die bei der Vernetzung entstandenen Schiffchen Basen und stabilisierte die kovalente Vernetzung. Die erhaltene Lösung der vernetzten Hämoglobine wurde in drei Teile (A, B und C) geteilt und unterschiedlich weiter verarbeitet.

Teil A blieb unverändert, die Bestimmung der Molekulargewichtsverteilung (gemäß Pötzschke H. et al. (1996, *Macromolecular Chemistry and Physics* 197, 1419 – 1437, sowie Pötzschke H. et al. (1996, *Macromolecular Chemistry and Physics* 197, 3229 - 3250) unter Anwendung der Volumenausschluss-Chromatographie mit dem Gel Sephacryl S-400 HR (Pharmacia Biotech, Freiburg, D) ergab für das vernetzte Schweinehämoglobin einen Modalwert der Molekulargewichtsverteilung von 520 kg/mol.

Die Polymeren des Anteils B wurden mit monofunktionell aktivem mPEG-SPA-1000 (Shearwater Polymers Europe, Enschede, NL) kovalent verknüpft: Zunächst wurde Natriumhydrogencarbonat als Festsubstanz bis zu einer Endkonzentration von 150 mmol/L zur Lösung der vernetzten Hämoglobine addiert, anschließend erfolgte die Zugabe von mPEG-SPA-1000 im 12-fachen molaren Überschuss (bezogen auf die Hämoglobin-Monomeren) ebenfalls als Festsubstanz. Nach einer Reaktionszeit von einer Stunde wurde Lysin im 60-fachen molaren Überschuss (bezogen auf Hämoglobin) zugegeben und reagierte mit noch aktiven mPEG-SPA-1000-Molekülen.

Teil C: Mit der Lösung der vernetzten Hämoglobine wurde genauso verfahren wie für Teil B beschrieben, jedoch unter Verwendung von mPEG-SPA-2000 (Shearwater Polymers Europe, Enschede, NL).

Anschließend erfolgte ein Lösungsmitteltausch in den drei Lösungen A, B und C (mit
5 Hilfe einer Ultrafiltration, „Ultraminisetze 10 kDa“, Pall Gelman Sciences, Roßdorf, D, oder einer Volumenausschluss-Chromatographie am Gel „Sephadex G-15 M“, Pharmacia Biotech, Freiburg, D) zu einer Lösung in einem wässrigen Elektrolyten (StLg) der Zusammensetzung: 125 mM NaCl, 4,5 mM KCl und 3 mM NaN₃.

Alle Produkte gemäß Lösung A, B oder C sind für den erfindungsgemäßen Zweck
10 geeignet.

Beispiel 6

Intramolekular vernetztes Hämoglobin wurde hergestellt wie in Beispiel 2 beschrieben, jedoch in 0.1%iger Konzentration.

15

Beispiel 7

Käufliches natürliches Humanmyoglobin (z.B. von Sigma,D) wurde gelchromatographisch gereinigt. Dieses kann erfindungsgemäß als solches oder auch modifiziert wie oben beschrieben eingesetzt werden.

20

Beispiel 8

12% eines nicht modifizierten Humanhämoglobins wie in Beispiel 1 beschrieben und 6 Gew. % eines wie in Beispiel 2 beschriebenen modifizierten Produktes wurden in 100 ml gereinigtes Wasser, enthaltend 0.9 Gew. % Natriumchlorid, 0,2 Gew. %
25 Natriumbicarbonat, 1 Gew. % Glukose, gegeben. Die Lösung ist sofort gebrauchsfertig.

Beispiel 9

10 Gew.% eines mit Polyethylenglykol modifizierten Humanmyoglobins, hergestellt gemäß Beispiel 3, Lösung A, wurde in 100 ml gereinigtes Wasser, enthaltend 0,9 Gew. % Natriumchlorid sowie 5 Gew. % Glukose, Insulin 20 IE/ml, gegeben.

30

Die Lösung ist sofort gebrauchsfertig und insbesondere auch haltbar.

II. Anwendungsbeispiele

Beispiel 10

- 5 Eine Lösung gemäß Beispiel 2 wurde einem männlichen Patienten, 67 Jahre, über einen Zeitraum von 6 Wochen im Abstand von 14 Tagen 3 mal verabreicht. In keinem Fall einer Gabe ließ sich eine Erhöhung des Transaminasen- Blutspiegels feststellen. Es finden sich auch keine Zeichen einer Immunreaktion.

10 Beispiel 11

Bei einem weiblichen Patienten im Alter von 65 Jahren erfolgte die gleiche Behandlung wie in Beispiel 10. Auch hier war keine Erhöhung des Transaminase-Spiegels und kein Zeichen einer Immunreaktion zu verzeichnen.

Patentansprüche

1. Verwendung eines oder mehrerer Sauerstoffträger ausgewählt aus Hämoglobin ,
Myoglobin oder Derivaten hiervon, zur Herstellung eines Mittels zur Behandlung
5 einer Organfunktionsstörung infolge eines akuten Versorgungsmangels und zur
Behandlung / Vermeidung einer Gewebeschädigung infolge einer solchen
Störung.
2. Verwendung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der akute
10 Versorgungsmangel durch Sauerstoffmangel, einen Nährstoffmangel oder
Kombinationen hiervon vorliegt:
3. Verwendung gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass ein
Sauerstoffmangel durch akute oder chronische Gefäßverengung, Stress,
15 Gefäßspasmus oder Arteriosklerose vorliegt.
4. Verwendung gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass der
Nährstoffmangel durch fehlende Elektrolyte, Glukose oder Insulin oder
Kombinationen bedingt ist.
20
5. Verwendung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass
der akute Versorgungsmangel Tinnitus, Herzinfarkt, Schlaganfall, Hörsturz,
Schwindel, Plazenta-Insuffizienz, Nierenschock oder Lungenschock ist.
- 25 6. Verwendung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5 , dadurch gekennzeichnet,
dass der oder die Sauerstoffträger menschlichen oder tierischen Ursprungs oder
modifizierte Derivate hiervon oder Mischungen hiervon sind.
7. Verwendung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass
30 der oder die Sauerstoffträger ausgewählt sind aus natürlichem oder modifiziertem
humanem oder Schweinehämoglobin oder Mischungen hiervon.

8. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass modifiziertes oder natürliches Myoglobin oder Mischungen hiervon eingesetzt wird.
- 5 9. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass Hämoglobin und Myoglobin oder modifizierte Derivate hiervon in einem Mischungsverhältnis von 1:20 bis 20:1 eingesetzt werden.
- 10 10. Verwendung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Modifikation des oder der Sauerstoffbinder eine intra-, intermolekulare Vernetzung, eine Pegylierung, eine Umsetzung mit chemisch reaktiven oder chemisch nicht reaktiven Effektoren oder eine Kombination hiervon ist.
- 15 11. Verwendung gemäß Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Modifikation eine intermolekulare Vernetzung, eine Pegylierung oder eine Kombination hiervon ist.
- 20 12. Verwendung gemäß Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass als Modifikation zusätzlich eine Umsetzung mit einem chemisch nicht reaktiven oder einem chemisch reaktiven Effektor oder einer Kombination hiervon vorliegt.
- 25 13. Verwendung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass der oder die Sauerstoffträger in Form einer wässrigen Lösung, enthaltend 0,2 bis 20 Gew. % des oder der Sauerstoffträger und 0,01 bis 20 Gew. % Zusatzstoffe, ausgewählt aus physiologisch verträglichen Salzen, Puffersubstanzen sowie Aminosäuren, Glukose, Insulin, Gewebefaktoren, oder Mischungen hiervon, eingesetzt werden.
- 30 14. Verwendung gemäß Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass 0,1 bis 20 Gew. % Zusatzstoffe enthalten sind und die physiologisch verträglichen Salze ausgewählt sind aus Natriumchlorid, Natriumhydrogen- Natriumbicarbonat,

Kaliumchlorid, Kalzium- Magnesiumchlorid, Natriumcitrat, Natriumlactat, oder Mischungen hiervon.

15. Verwendung gemäß einem der Ansprüche 13 oder 14, dadurch gekennzeichnet,
5 dass die Zusatzstoffe ausgewählt sind aus 0,9 % Natriumchlorid, und 1 % Glukose sowie Insulin in physiologischer Dosierung.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 03/03911

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 A61K38/42 A61P39/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, EMBASE, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DE 100 31 742 A (SANGUIBIO TECH AG) 17 January 2002 (2002-01-17) cited in the application paragraph '0001! - paragraph '0002!	1-15
X	WO 97 35883 A (NORTHFIELD LAB ; DEWOSKIN RICHARD E (US); DOUBLEDAY MARC D (US)) 2 October 1997 (1997-10-02) page 7, line 14 - line 20; claim 1	1-15
X	US 5 854 210 A (COLE DANIEL J ET AL) 29 December 1998 (1998-12-29) claim 27	1-15
X	US 6 054 427 A (WINSLOW ROBERT M) 25 April 2000 (2000-04-25) column 32 - column 33; claims 1,24; tables 3,4	1-15
	-/-	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

9 July 2003

Date of mailing of the international search report

15/07/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Winger, R.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 03/03911

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 6 046 161 A (PRZYBELSKI ROBERT J) 4 April 2000 (2000-04-04) column 5, line 55 - column 6, line 50	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 03/03911

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE 10031742	A	17-01-2002	DE 10031742 A1	17-01-2002
			AU 7964101 A	08-01-2002
			WO 0200229 A1	03-01-2002
			EP 1294385 A1	26-03-2003
WO 9735883	A	02-10-1997	AP 1028 A	30-11-2001
			AT 241646 T	15-06-2003
			AU 740210 B2	01-11-2001
			AU 2425397 A	17-10-1997
			BG 102810 A	30-09-1999
			BR 9708388 A	04-01-2000
			CA 2250274 A1	02-10-1997
			CN 1219939 A	16-06-1999
			CZ 9803100 A3	15-09-1999
			DE 69722422 D1	03-07-2003
			EP 1308460 A2	07-05-2003
			EP 0928294 A1	14-07-1999
			JP 2000507947 T	27-06-2000
			KR 2000005058 A	25-01-2000
			NO 984473 A	25-11-1998
			NZ 332067 A	30-03-2001
			PL 329108 A1	15-03-1999
			SK 134398 A3	18-01-2001
			WO 9735883 A1	02-10-1997
			US 2002025343 A1	28-02-2002
US 5854210	A	29-12-1998	AU 693354 B2	25-06-1998
			AU 5537296 A	30-10-1996
			EP 0767675 A1	16-04-1997
			JP 10501823 T	17-02-1998
			NO 965247 A	09-12-1996
			WO 9632130 A1	17-10-1996
			ZA 9602843 A	11-10-1996
US 6054427	A	25-04-2000	US 5814601 A	29-09-1998
			AU 735799 B2	12-07-2001
			EP 1011710 A1	28-06-2000
			JP 2002514207 T	14-05-2002
			US 2003083233 A1	01-05-2003
			US 6432918 B1	13-08-2002
			AU 6538198 A	18-09-1998
			WO 9837909 A1	03-09-1998
US 6046161	A	04-04-2000	US 6090779 A	18-07-2000
			US 5614490 A	25-03-1997
			US 5510464 A	23-04-1996
			US 5334706 A	02-08-1994
			US 6022850 A	08-02-2000
			US 5900477 A	04-05-1999
			US 6117838 A	12-09-2000
			CA 2087504 A1	31-07-1993
			JP 2992855 B2	20-12-1999
			JP 5255108 A	05-10-1993
			JP 10306036 A	17-11-1998

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/03911

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 A61K38/42 A61P39/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der Internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, EMBASE, BIOSIS

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	DE 100 31 742 A (SANGUIBIO TECH AG) 17. Januar 2002 (2002-01-17) in der Anmeldung erwähnt Absatz '0001! - Absatz '0002!	1-15
X	WO 97 35883 A (NORTHFIELD LAB ; DEWOSKIN RICHARD E (US); DOUBLEDAY MARC D (US)) 2. Oktober 1997 (1997-10-02) Seite 7, Zeile 14 - Zeile 20; Anspruch 1	1-15
X	US 5 854 210 A (COLE DANIEL J ET AL) 29. Dezember 1998 (1998-12-29) Anspruch 27	1-15
X	US 6 054 427 A (WINSLOW ROBERT M) 25. April 2000 (2000-04-25) Spalte 32 - Spalte 33; Ansprüche 1,24; Tabellen 3,4	1-15
-/--		

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindarischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindarischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

G Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der Internationalen Recherche

9. Juli 2003

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

15/07/2003

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Beauftragter

Winger, R.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/03911

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 6 046 161 A (PRZYBELSKI ROBERT J) 4. April 2000 (2000-04-04) Spalte 5, Zeile 55 - Spalte 6, Zeile 50	1-15

INTERNATIONAL RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/03911

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
DE 10031742 A	17-01-2002	DE 10031742 A1	17-01-2002
		AU 7964101 A	08-01-2002
		WO 0200229 A1	03-01-2002
		EP 1294385 A1	26-03-2003
WO 9735883 A	02-10-1997	AP 1028 A	30-11-2001
		AT 241646 T	15-06-2003
		AU 740210 B2	01-11-2001
		AU 2425397 A	17-10-1997
		BG 102810 A	30-09-1999
		BR 9708388 A	04-01-2000
		CA 2250274 A1	02-10-1997
		CN 1219939 A	16-06-1999
		CZ 9803100 A3	15-09-1999
		DE 69722422 D1	03-07-2003
		EP 1308460 A2	07-05-2003
		EP 0928294 A1	14-07-1999
		JP 2000507947 T	27-06-2000
		KR 2000005058 A	25-01-2000
		NO 984473 A	25-11-1998
		NZ 332067 A	30-03-2001
		PL 329108 A1	15-03-1999
		SK 134398 A3	18-01-2001
		WO 9735883 A1	02-10-1997
		US 2002025343 A1	28-02-2002
US 5854210 A	29-12-1998	AU 693354 B2	25-06-1998
		AU 5537296 A	30-10-1996
		EP 0767675 A1	16-04-1997
		JP 10501823 T	17-02-1998
		NO 965247 A	09-12-1996
		WO 9632130 A1	17-10-1996
		ZA 9602843 A	11-10-1996
US 6054427 A	25-04-2000	US 5814601 A	29-09-1998
		AU 735799 B2	12-07-2001
		EP 1011710 A1	28-06-2000
		JP 2002514207 T	14-05-2002
		US 2003083233 A1	01-05-2003
		US 6432918 B1	13-08-2002
		AU 6538198 A	18-09-1998
		WO 9837909 A1	03-09-1998
US 6046161 A	04-04-2000	US 6090779 A	18-07-2000
		US 5614490 A	25-03-1997
		US 5510464 A	23-04-1996
		US 5334706 A	02-08-1994
		US 6022850 A	08-02-2000
		US 5900477 A	04-05-1999
		US 6117838 A	12-09-2000
		CA 2087504 A1	31-07-1993
		JP 2992855 B2	20-12-1999
		JP 5255108 A	05-10-1993
		JP 10306036 A	17-11-1998